

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 285**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2013 PCT/EP2013/051047**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013 WO13107907**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2013 E 13701421 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2805166**

54 Título: **Método para el pronóstico del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido**

30 Prioridad:

20.01.2012 EP 12151875

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2019

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (20.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ PARIS VII (DENIS DIDEROT)
(20.0%);
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES - PARIS V
(20.0%);
ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS
(20.0%) y
SORBONNE UNIVERSITÉ (20.0%)**

72 Inventor/es:

**DIEU-NOSJEAN, MARIE-CAROLINE;
FRIDMAN, WOLF HERVÉ;
REMARK, ROMAIN y
SAUTES-FRIDMAN, CATHERINE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 707 285 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para el pronóstico del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido.

10 **Estado de la técnica**

Como se indica en Dieu-Nosjean et al., (J Clin Oncol 26:4410-4417. 2008), el cáncer broncopulmonar es la causa más común de muerte relacionada con cáncer en el mundo. Aproximadamente de un 80 % a un 90 % de los casos implican cáncer broncopulmonar no microcítico (NSCLC), que incluye adenocarcinoma y carcinoma escamocelular. Únicamente los pacientes cuyos tumores pueden researse completamente tienen una posibilidad significativa de supervivencia aumentada. Sin embargo, tanto como un 30 % de los pacientes con enfermedad en fase I experimentan recidiva después de cirugía. La correlación entre células inmunitarias de infiltración tumoral y el pronóstico de los pacientes con cáncer broncopulmonar es controvertida.

Un tumor está compuesto de células malignas, estromales, endoteliales e inmunitarias que forman una red heterogénea y muestran interacciones complejas. Aunque la erradicación del tumor por el sistema inmunitario a menudo es ineficaz, hay evidencias de que muchos cánceres en desarrollo no se ven ignorados por el sistema inmunitario. Las regresiones tumorales espontáneas que se producen simultáneamente con las manifestaciones autoinmunitarias y la mayor incidencia de los tumores en pacientes inmunosuprimidos son indicaciones de la implicación del sistema inmunitario en el rechazo del tumor. Los ratones con funciones inmunitarias deficientes desarrollan espontáneamente tumores. La densidad de linfocitos de infiltración tumoral (TIL) con fenotipos citotóxicos y de memoria es altamente predictiva de un buen resultado clínico. Sin embargo, aunque el pronóstico está relacionado con la migración dirigida de las células inmunitarias efectoras, aún no está claro donde tiene lugar la activación de la respuesta inmunitaria específica: en el tumor, el ganglio linfático de drenaje o ambos.

Ahora está bien establecido que las respuestas inmunitarias pueden tener lugar a una distancia de órganos linfoides secundarios, en estructuras linfoides terciarias (TLS). Dieu-Nosjean et al., han observado que estas estructuras de tipo ganglio linfático pueden desarrollarse en pacientes con cáncer broncopulmonar. Se han llamado "tejidos linfoides asociados con bronquios inducido por tumor" (Ti-BALT) ya que nunca se encontraban en los tejidos no tumorales de pacientes con NSCLC. Además, Dieu-Nosjean et al., han demostrado que la densidad de DC maduras, una población que se detectó selectivamente en Ti-BALT, está asociada con un resultado clínico favorable, lo que sugiere que representa un sitio de activación para linfocitos T específicos de tumor.

La presencia de TLS se ha presentado en otros tumores humanos (por ejemplo, colorrectal y de mama (Gobert et al., Cancer Res 2009; 69(5) 2000-2009) que indica que surgen estructuras linfoides ectópicas en muchos tumores sólidos.

Ladanyi et al., (Cancer Immunol Immunother. Dic. 2011;60(12):1729-38) divulgan el impacto pronóstico de la densidad de linfocitos B en melanoma cutáneo. Nelson (J Immunol. 1 nov. 2010;185(9):4977-82) es una revisión que compara las respuestas de linfocitos B en cáncer, la autoinmunidad y el trasplante, con el objetivo de dilucidar los mecanismos usados por los linfocitos B para facilitar las respuestas de linfocitos T a largo plazo. La solicitud de patente europea publicada con la referencia EP 1 777 523 divulga métodos para determinar el pronóstico de un paciente que padece cáncer cuantificando, en una muestra de tumor, al menos un marcador biológico que es indicativo del estado de la respuesta inmunitaria adaptativa de dicho paciente contra el cáncer.

Sautes-Fridman et al., (Cancer Metastasis Rev. Mar. 2011;30(1):13-25) la influencia del contexto infeccioso y la organización de infiltración de células inmunitarias en la progresión de cánceres broncopulmonares no microcíticos (NSCLC) humanos.

Fridman et al., (Curr Top Microbiol Immunol. 2011;344:1-24) y Pages et al., (Oncogene. 25 feb. 2010;29(8):1093-102) analizan la importancia pronóstica de la infiltración inmunitaria en cáncer humano.

Dieu-Nosjean et al., (J Clin Oncol. 20 sep. 2008;26(27):4410-7) divulgan que el número de DC maduras de infiltración tumoral puede permitir la identificación de pacientes con NSCLC en fase temprana que tienen un alto riesgo de recidiva.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido, que comprende la cuantificación de la densidad celular de linfocitos B foliculares presentes en estructuras linfoides inducidas por tumor de dicho paciente, en el que una alta densidad de linfocitos B foliculares indica que el paciente tiene un pronóstico favorable y una baja densidad de linfocitos B foliculares indica que el paciente tiene un mal pronóstico.

La presente invención proporciona un método novedoso para el pronóstico del tiempo de supervivencia de pacientes con cáncer sólido. El método es de mayor precisión que los métodos de estadificación usados actualmente (por ejemplo, UICC-TNM) y, por tanto, cumple una necesidad desde hace mucho tiempo y actual en la técnica de predecir de forma correcta y precisa el curso probable o resultado del cáncer en un paciente, que se refleja en el tiempo de supervivencia. La capacidad de hacerlo posibilita a los facultativos médicos a adaptar individualmente los protocolos de tratamiento del cáncer a pacientes particulares. Los pacientes, de acuerdo con el presente método, que tienen una alta probabilidad de un buen resultado al tratamiento puede que no necesiten recibir los tratamientos más agresivos para experimentar un resultado favorable y, por tanto, pueden evitar o minimizar los efectos secundarios asociados con dichos tratamientos, mientras que los pacientes con un mal pronóstico pueden tratarse de forma agresiva en la fase más temprana posible de la enfermedad o mediante otro tratamiento diferente al usado.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido, que comprende las siguientes etapas:

- a) cuantificar en una estructura linfoide inducida por tumor, la densidad celular de linfocitos B foliculares, y
- b) comparar el valor de densidad celular de linfocitos B foliculares obtenido en la etapa a) con un valor de referencia predeterminado; y
- c) proporcionar un pronóstico favorable de tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando la densidad celular de linfocitos B foliculares es mayor que dicho valor de referencia predeterminado, o proporcionar un mal pronóstico de tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando la densidad celular de linfocitos B foliculares es menor que dicho valor de referencia predeterminado.

Por estructura linfoide inducida por tumor se entiende la organización de leucocitos de infiltración tumoral en la estructura de tipo ganglio linfático en el estroma de la masa tumoral y está compuesta de grupos de células dendríticas maduras-lymfocitos T (zonas de linfocitos T) y folículos de linfocitos B (zonas de linfocitos B). Típicamente, dependiendo de la sección del tumor, puede observarse únicamente una de las dos zonas o ambas zonas.

Por linfocitos B foliculares se entiende los subconjuntos de linfocitos B agrupados en folículos de linfocitos B. Son principalmente de fenotipo virgen y germinal central.

La supervivencia puede ser la supervivencia específica de enfermedad (DSS), la supervivencia sin enfermedad (DFS) o la supervivencia global (OS).

La presente invención posibilita la evaluación del riesgo de recidiva de un paciente que se ha tratado quirúrgicamente y, si fuera necesario, que ha recibido posteriormente el tratamiento apropiado (tal como radioterapia, quimioterapia y/o terapia hormonal).

El método de pronóstico de acuerdo con la invención puede usarse en solitario o en combinación con cualquier otro método ya usado para la evaluación pronóstica de cánceres sólidos, incluyendo la fase, los parámetros demográficos y antropométricos, los resultados del examen clínico o de laboratorio rutinario, incluyendo el tamaño del tumor, la clasificación histopronóstica, los receptores hormonales, el oncotipo, etc.

En una realización preferida, el método de la invención comprende además las etapas de:

- a) cuantificar en el tumor completo la densidad celular de células dendríticas maduras, y
- b) comparar el valor de densidad celular de células dendríticas maduras obtenido en la etapa a) con un valor de referencia predeterminado; y
- c) proporcionar un pronóstico favorable de tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando las densidades celulares tanto de los linfocitos B foliculares como de las células dendríticas maduras son mayores que dichos valores de referencia predeterminados,

proporcionar un mal pronóstico de tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando las densidades celulares tanto de linfocitos B foliculares como de las células dendríticas maduras son inferiores a dichos valores de referencia predeterminados, o

proporcionar un pronóstico intermedio de tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando un valor de las densidades celulares de linfocitos B foliculares y de las células dendríticas maduras es inferior a dicho valor de referencia predeterminado y el otro valor es mayor que dicho otro valor de referencia predeterminado.

Por células dendríticas maduras se entiende una población de células dendríticas que son profesionales para la presentación de antígenos procesados a linfocitos T. Las células dendríticas maduras de infiltración tumoral están ubicadas selectivamente en contacto con linfocitos T, en las zonas ricas en linfocitos T de la estructura linfoide inducida por tumor.

Típicamente, la densidad de linfocitos B foliculares y la densidad de células dendríticas maduras puede medirse, por

ejemplo, por inmunohistoquímica realizada en secciones de tumor (secciones tisulares congeladas o incluidas en parafina) de muestra obtenida por biopsia.

5 En una realización de la invención, los linfocitos B totales se detectan por inmunohistoquímica con un anticuerpo contra la molécula CD20. Entre los linfocitos B totales, los linfocitos B foliculares se cuentan selectivamente en la sección de tumor completo.

10 En una realización de la invención, las células dendríticas maduras se detectan por inmunohistoquímica con un anticuerpo contra la molécula DC-Lamp (CD208). Las células dendríticas maduras se cuentan en la sección de tumor completo. La densidad de células puede expresarse como el número de células que se cuentan por una unidad de área superficial de la sección de tumor, por ejemplo, como en número de células que se cuentan por campo de energía intermedia (aumento original x 100) o mm² de área superficial del tumor.

15 Como los linfocitos B foliculares se organizan en un agregado celular en el folículo de linfocitos B y como representan más de un 98 % de las células totales presentes en el folículo de linfocitos B, la densidad de linfocitos B foliculares también puede medirse como una superficie total de folículos de linfocitos B por una unidad de área superficial del tumor, por ejemplo, como el área superficial de folículos de linfocitos B en mm² por campo de energía intermedia (aumento original x 100) o mm² de área superficial del tumor.

20 Típicamente, los valores de referencia predeterminados para la densidad celular de linfocitos B foliculares y para la densidad celular de células dendríticas maduras pueden determinarse aplicando métodos estadísticos en estudios a gran escala en pacientes de cáncer.

Ejemplos de cánceres sólidos con estructuras linfoides inducidas por tumor son cánceres broncopulmonares, cánceres colorrectales y cánceres de mama.

25 En una realización preferida, el cáncer sólido es un cáncer broncopulmonar.

En una realización más preferida, el cáncer sólido es un cáncer broncopulmonar no microcítico.

30 En una realización de la invención, el paciente es un paciente con una fase temprana de cáncer, tal como cáncer en fase I.

En una realización alternativa de la invención, el paciente es un paciente operable con fase avanzada de cáncer (hasta cáncer en fase IIIb).

35 Las fases de cáncer de mama y cáncer colorrectal se definen, por ejemplo, en UICC. TNM Classification of Malignant Tumours. 6.^a ed. Sobin LH, Wittekind Ch (ed.) Wiley-Liss: Nueva York, 2002.

En una realización de la invención, el paciente es un paciente con fase temprana de cáncer que no recibió ningún tratamiento neoadyuvante, ni adyuvante, tal como quimioterapia y/o radioterapia.

40 En una realización alternativa de la invención, el paciente es un paciente con fase avanzada de cáncer que recibe tratamiento adyuvante con o sin tratamiento neoadyuvante, tal como quimioterapia y/o radioterapia.

A continuación, se ilustrará la invención mediante los siguientes ejemplos, así como las tablas y figuras.

45 **Descripción de las figuras**

Figura 1. Caracterización de subconjuntos de linfocitos B dentro y fuera de Ti-BALT

50 Inmunotinciones sencillas (A-B, E-F, M-N) y dobles (C-D, G-L) en secciones de ganglio linfático incluido en parafina (columna de la izquierda) y de tumor broncopulmonar (columna de la derecha). Las zonas de linfocitos B de Ti-BALT presentan características de folículos secundarios de ganglios linfáticos reactivos, ya que están compuestas de: un manto de linfocitos B vírgenes IgD+ (gris oscuro, B) que rodean un centro germinal. Como en los ganglios linfáticos, los linfocitos B del centro germinal CD20+ (gris oscuro, D, H, J, L) expresan CD23 (negro, D), AID (gris oscuro, F), Ki67 (negro, H) y Bcl6 (negro, J) pero no Bcl2 (negro, L). Las células plasmáticas CD138+ (gris oscuro) se detectan exclusivamente en la reacción de estroma (N) pero nunca en Ti-BALT (datos no mostrados). Aumento original: (A-D, K-L), x 100; (E-J, M-N), x 200. Abreviatura: T, foco del tumor.

Figura 2. Comparación de los subconjuntos de linfocitos B de infiltración en tumores pulmonares, órganos linfoides secundarios convencionales y sangre periférica

60 Análisis de citometría de flujo de subconjuntos de linfocitos B CD19+ CD14- en tumores broncopulmonares (n=7), ganglios linfáticos (n=3) y sangre periférica (n=5). Diagramas de puntos representativos (A) y medias (B) de subconjuntos de linfocitos B basados en la expresión de IgD y CD38 en las 3 ubicaciones. Cada barra representa una media +/- DT de diferentes muestras. La significación estadística de subconjuntos de linfocitos B entre los sitios se calculó por ensayo de Mann-Whitney. *, P<0,05. (C) Comparación de la relación de las diferentes fases de diferenciación de linfocitos B vírgenes (CD23- CD27- CD38- Bm1 y CD23+ CD27- CD38- Bm2, panel de la izquierda), linfocitos B del centro germinal (CD23- CD27-CD77+ CD38+ Bm3 y CD23- CD27- CD77- CD38+ Bm4, panel central) y linfocitos B de memoria (CD23- CD27+ CD38+ Bm5 temprano y CD23-

CD27+ CD38- Bm5 tardío, panel de la derecha). Abreviaturas: pre-GC, centro pregerminal; GC, centro germinal.

Figura 3. Valor pronóstico de linfocitos B de Ti-BALT en pacientes con NSCLC

(A) Correlación entre la densidad de DC maduras DC-Lamp+ y la densidad de linfocitos B foliculares CD20+, ambas poblaciones ubicadas en Ti-BALT. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia específica de enfermedad para 74 pacientes con NSCLC en fase temprana de acuerdo con la densidad de linfocitos B foliculares CD20+ (B), la densidad de DC maduras DC-Lamp+ (C) y la densidad de ambas poblaciones celulares (D). El valor *p* se determinó usando el ensayo del orden logarítmico. Abreviatura: DSS, supervivencia específica de enfermedad.

Figura 4. Valor pronóstico de DC maduras en pacientes con NSCLC en fase tardía que recibieron quimioterapia no adyuvante

Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia específica de enfermedad de 56 pacientes de acuerdo con la densidad de DC maduras DC-Lamp+ de infiltración tumoral. Se evaluaron las diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes usando el ensayo del orden logarítmico. La mediana de DSS fue 17 meses para los pacientes con tumores de bajo DC-Lamp, mientras que era de 36 meses para los pacientes caracterizados con tumores de alto DC-Lamp. Valor *p* significativo cuando <0,05.

Figura 5. Valor pronóstico de linfocitos B foliculares de infiltración tumoral y/o DC maduras en pacientes con NSCLC en fase tardía que recibieron quimioterapia neoadyuvante.

Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global de 122 pacientes con fase avanzada de NSCLC y tratados con quimioterapia neoadyuvante de acuerdo con la presencia de una densidad alta o baja de infiltración tumoral de (A) linfocitos B foliculares CD20+, (B) DC maduras DC-Lamp+ o (C) tanto linfocitos B foliculares CD20+ como DC maduras DC-Lamp+. Las diferencias significativas entre los grupos de pacientes se evaluaron usando el ensayo del orden logarítmico. Valor *p* significativo cuando <0,05. Abreviatura: OS, supervivencia global.

Tablas

Tabla 1. Parámetros clínicos, histológicos e inmunológicos en pacientes con tumores "bajos en linfocitos B foliculares" frente a "altos en linfocitos B foliculares"

La estadificación patológica y los tipos histológicos de cáncer broncopulmonar se determinaron de acuerdo con el sistema de estadificación TNM (Piemonte. NY, Wiley-Liss, 2002) y con la clasificación histológica de la OMS (Brambilla et al., Eur Respir. J., 2001), respectivamente. Abreviaturas: NSCLC, cáncer broncopulmonar no microcítico; ADC, adenocarcinoma; SCC, carcinoma escamocelular; pTNM, TNM patológico. Todos los parámetros se evaluaron entre 74 NSCLC en fase tardía. Los valores-p se obtuvieron usando los ensayos exactos de Fisher y de Bonferroni-Dunn. Abreviatura: ETM, error típico de las mediciones.

	Bajo en linfocitos B foliculares		Alto en linfocitos B foliculares		Significación (valor p)
	N.º	%	N.º	%	
Densidad de linfocitos B CD20+ foliculares					<0,0001
media±ETM	0,011 ± 0,002	-	0,097 ± 0,014	-	
intervalo	0,000-0,029		0,031-0,442		
Género	masculino / femenino		26/10 72/28		0,0553
Edad					0,9665
media (años) ± ETM	67 ± 1	-	67 ± 2	-	
intervalo	49-83		43-81		
Historial de tabaquismo					0,8374
fumador actual/nunca	35/2	95/5	31/5	86/14	
paquete-año (años) ± ETM	45 ± 4		45 ± 5		
intervalo	0-100		0-100		
Tipo histológico					0,8560
ADC	24	63	22	61	
SCC	14	37	14	39	
Diferenciación tumoral					0,0819
buena	19	50	9	25	
Intermedia	10	26	12	33	
mala	9	24	15	42	
Fase de pTNM					0,3623
pT1N0M0	27	71	21	58	
pT2N0M0	7	18	7	20	
pT1N1M0	4	11	8	22	

La estadificación patológica y los tipos histológicos de cáncer broncopulmonar se determinaron de acuerdo con el sistema de estadificación TNM (Piemonte. NY, Wiley-Liss, 2002) y con la clasificación histológica de la OMS (Brambilla et al., Eur Respir. J., 2001), respectivamente. Abreviaturas: NSCLC, cáncer broncopulmonar no microcítico; ADC, adenocarcinoma; SCC, carcinoma escamocelular; pTNM, TNM patológico. Todos los parámetros se evaluaron entre 74 NSCLC en fase tardía. Los valores-p se obtuvieron usando los ensayos exactos de Fisher y de Bonferroni-Dunn. Abreviatura: ETM, error típico de las mediciones.					
	Bajo en linfocitos B foliculares		Alto en linfocitos B foliculares		Significación
	N.º	%	N.º	%	(valor p)
% de fibrosis					0,1877
media±ETM	22 ± 3	-	28 ± 3	-	
intervalo	0-75		0-85		
% de necrosis					0,6888
media±ETM	13 ± 3	-	11 ± 3	-	
intervalo	1-75		1-50		
% de células tumorales Ki67					0,8895
media±ETM	36 ± 4	-	36 ± 4	-	
intervalo	1-80		2-80		
Densidad de DC maduras DC-Lamp+					0,0002
media±ETM	2,652 ± 0,444	-	7,049 ± 1,034	-	
intervalo	0-12,935		0,500-31,667		
Densidad de linfocitos T CD3+ (centro del tumor)					0,2067
media±ETM	1,579 ± 0,184	-	1,931 ± 0,206	-	
intervalo	0,000-5,000		0,000-5,000		
Densidad de linfocitos T CD3+ (margen invasivo)					<0,0001
media±ETM	1,487 ± 0,112	-	2,542 ± 0,172	-	
intervalo	0,000-3,000		0,500-5,000		

Tabla 2. Características clínicas y patológicas de pacientes con NSCLC incluidos en el estudio retrospectivo

La estadificación patológica y los tipos histológicos de cáncer broncopulmonar se determinaron de acuerdo con el sistema de estadificación TNM (Piemonte. NY, Wiley-Liss, 2002) y con la clasificación histológica de la OMS (Brambilla et al., Eur Respir. J., 2001), respectivamente. Abreviaturas: NSCLC, cáncer broncopulmonar no microcítico; ADC, adenocarcinoma; SCC, carcinoma escamocelular; pTNM, TNM patológico.		
	Total	
	N.º	%
Género		
masculino / femenino	60/14	81/19
Edad		
media (años) ± ETM	64 ± 1	
intervalo	41-79	
Historial de tabaquismo		
fumador actual/nunca	67/7	91/9
paquete-año (años) ± ETM	45 ± 3	
intervalo	0-100	
Estado vital de los pacientes		
vivo	54	73
sin enfermedad en recidiva	51	
	3	
muerto	20	27
de metástasis de NSCLC	9	
de otras causas	11	
Tipo histológico		
ADC	46	62
SCC	28	38
Fase de pTNM		
pT1N0M0	48	65
pT2N0M0	14	19
pT1N1M0	12	16
Diferenciación tumoral		
buena	28	38
Intermedia	22	30
mala	24	32

La estadificación patológica y los tipos histológicos de cáncer broncopulmonar se determinaron de acuerdo con el sistema de estadificación TNM (Piemonte. NY, Wiley-Liss, 2002) y con la clasificación histológica de la OMS (Brambilla et al., Eur Respir. J., 2001), respectivamente. Abreviaturas: NSCLC, cáncer broncopulmonar no microcítico; ADC, adenocarcinoma; SCC, carcinoma escamocelular; pTNM, TNM patológico.		
	Total	
	N.º	%
% de fibrosis		
media±ETM	25 ± 2	
intervalo	0-85	
% de necrosis		
media±ETM	12 ± 2	
intervalo	1-75	
% de células tumorales Ki67**		
media±ETM	36 ± 3	
intervalo	1-80	

Tabla 3. Parámetros pronósticos para supervivencia en análisis univariante para pacientes con enfermedad avanzada y tratados por quimioterapia neoadyuvante.

	Variable	Tasa de riesgo	IC 95 %	Valor p
Parámetros clínicos	Género	0,75	0,39 a 1,43	0,383
	Edad	1,45	0,74 a 2,84	0,283
	Historial de tabaquismo	0,83	0,43 a 1,58	0,565
	EPOC	0,42	0,75 a 1,97	0,418
	Lado	1,17	0,69 a 1,96	0,562
	Intervención	1,38	1,07 a 1,78	0,012
	Calidad de resección	2,65	1,33 a 5,29	0,00585
	Subtipo histológico	0,90	0,79 a 1,02	0,109
	Fármacos quimioterapéuticos	0,92	0,71 a 1,20	0,548
	Número de ciclos	0,50	0,31 a 0,81	0,0044
	Tiempo entre quimioterapia y cirugía	0,96	0,64 a 1,42	0,826
	% de células tumorales viables	1,66	1,05 a 2,63	0,0313
	Fase de TNM después de quimioterapia	1,53	1,12 a 2,08	0,00678
Parámetros inmunitarios	Densidad de células DC-LAMP+	0,50	0,30 a 0,83	0,00721
	Densidad de células CD20+	0,41	0,24 a 0,70	0,00095
	Puntuación inmunitaria	0,50	0,36 a 0,72	0,000097

5 Ejemplos

En la siguiente descripción se realizan todos los experimentos de biología molecular para los que no se da un protocolo detallado de acuerdo con el protocolo convencional.

10 Abreviaturas

ADC, adenocarcinoma; BALT, tejido linfoide asociado con bronquios; DC, célula dendrítica; NSCLC, cáncer broncopulmonar no microcítico; SCC, carcinoma de escamocelular; TIL, linfocito de infiltración tumoral.

15 Ejemplo 1

Sumario

20 El objetivo del presente estudio fue determinar si una respuesta inmunitaria humoral protectora tiene lugar dentro de Ti-BALT.

25 En esta ocasión, se estudió la diferenciación de linfocitos B y la migración a Ti-Balt usando estrategias complementarias (inmunohistoquímica, citometría de flujo, microdissección de captura con láser, matriz de baja densidad de PCR) en una serie de 104 pacientes con NSCLC. Se ha demostrado que los folículos de linfocitos B de Ti-Balt presentan la misma composición celular y organización que en órganos linfoides secundarios canónicos. Todas las fases de diferenciación podían detectarse entre los linfocitos B de infiltración tumoral. De forma interesante, los compartimentos de linfocitos B principales eran compartimentos que comprenden células efectoras (linfocitos B de memoria y células plasmáticas). También se ha demostrado que la mutación somática y las maquinarias de cambio de isotipo se activan en folículos de linfocitos B de Ti-Balt de acuerdo con la presencia de

células Bm3 y Bm4. También se ha estudiado el reclutamiento de linfocitos B a Ti-Balt para identificar los quimioatrayentes que orquestan esta migración. De forma interesante, las vénulas endoteliales de alto PNAd+ intratumorales estaban asociadas exclusivamente con Ti-Balt. El ligando PNAd+, CD62L, se detectó selectivamente en la mayoría de linfocitos de Ti-Balt incluyendo todos los linfocitos B, pero no en linfocitos B del centro germinal, como se informa para órganos linfoides secundarios convencionales. El análisis de los perfiles de receptores de quimiocinas indicó que CXCR5 se expresa por linfocitos B vírgenes, que equivale a la expresión de su ligando único, CXCL13 en las zonas de linfocitos B de Ti-Balt. Finalmente, la expresión de CXCR5 disminuyó en linfocitos B completamente diferenciados, un proceso regulador clave conocido que permite que las células efectoras abandonen el centro germinal, como se describió previamente en ganglios linfáticos.

Finalmente, se demostró que la densidad de linfocitos B de Ti-Balt está correlacionada con la supervivencia a largo plazo para pacientes con cáncer broncopulmonar.

En conjunto, estos datos indican que Ti-Balt presenta fuerte similitud con el órgano linfoide canónico, un sitio especializado en la inducción y establecimiento de memoria de las respuestas inmunitarias adaptativas. Por tanto, Ti-Balt representa un sitio activo para el inicio de una inmunidad humoral protectora. La cuantificación de linfocitos B foliculares permitiría la identificación de pacientes de alto riesgo.

Materiales y métodos

Pacientes

Se obtuvieron muestras de tumor broncopulmonar frescas e incluidas en parafina de pacientes con NSCLC que experimentan cirugía en Institut Mutualiste Montsouris, Hotel Dieu, Tenon y hospitales European Georges Pompidou (París, Francia). La evaluación preoperatoria de los pacientes incluyó exploración por TAC de pulmón, cerebro y glándulas suprarrenales y ecografía por ultrasonidos del hígado. Todos experimentaron una resección quirúrgica completa de sus tumores, incluyendo muestreo de ganglios linfáticos a múltiples niveles o linfadenectomía, pero ninguno recibió quimioterapia o radioterapia preoperatoria. Los pacientes con un estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group (Finkelstein et al., JCO, 1988) < 1 fueron elegibles. Para el estudio retrospectivo, se recuperaron biopsias de tumor incluidas en parafina con zonas representativas de tumor y parénquima pulmonar adyacente de 74 pacientes sucesivos diagnosticados entre 1998 y 2002 con NSCLC en fase temprana (Mountain, Cancer Chest, 1997). Las características clínicas y patológicas principales de los pacientes para el estudio retrospectivo se presentan en la tabla 2. Los pacientes con características histológicas mixtas, un tumor T3 o invasión pleural no fueron elegibles. Al completarse el estudio, el seguimiento clínico mínimo fue de 48 meses para el último paciente incluido en la cohorte. Se obtuvieron ganglios linfáticos no tumorales después de la cirugía de pacientes que padecen cardiopatías. Se obtuvo sangre periférica de voluntarios sanos en el "Centre National de la Transfusion Sanguine" (París, Francia). El protocolo se aprobó por el comité ético y de investigaciones en seres humanos local (n.º 2008-133) y por el Assistance Publique-Hopitaux de Paris (AP-HP), en aplicación del artículo L.1121-1 de la ley francesa. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito de los pacientes antes de su inclusión en el estudio.

Inmunohistoquímica

Secciones tisulares de 5 µm en serie de tumores broncopulmonares incluidos en parafina se desparafinaron y se pretrataron en tampón apropiado para la recuperación del antígeno. Después, las secciones se incubaron con suero humano al 5 % durante 30 min antes de añadir los anticuerpos apropiados o controles de isotipo. La actividad enzimática se reveló como se describe previamente (MCD, JCO, 2008). Cuando fue necesario, las secciones se tiñeron con contraste con hematoxilina. Las imágenes se adquirieron usando un microscopio Nikon Eclipse 80i (Nikon, Champigny-sur-Marne, Francia) gestionado con el programa informático Nikon NIS Elements BR.

Método para la cuantificación celular

La cuantificación celular se midió cuantitativamente en las zonas tumorales de la sección de tejido completo (aumento original: x 100) usando el microscopio Nikon Eclipse 80i y gestionado con el programa informático Nikon NIS Elements BR. La densidad de linfocitos B foliculares de Ti-BALT se expresó como una superficie de linfocitos B CD20+ foliculares por campo de energía intermedia (IPF) del tumor con el ETM calculado. El número de DC maduras DC-Lamp⁺ fue inferior al número de células descrito anteriormente, que permite lograr un recuento cuantitativo (media de DC por IPF del tumor con el ETM calculado). De acuerdo con la evaluación convencional por los patólogos, se contó la necrosis y la fibrosis como el porcentaje de zonas positivas entre la sección de masa tumoral completa.

Enriquecimiento de linfocitos de infiltración tumoral

Muestras frescas de tumor broncopulmonar se disociaron mecánicamente y se incubaron en una solución no enzimática (solución de recuperación celular, BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, Francia) durante 1 h a 4 °C. Las suspensiones celulares después se filtraron a través de un filtro de 70 µm (BD Biosciences) y las células

mononucleares se aislaron por centrifugación sobre Ficoll Hypaque.

Citometría de flujo

5 Se realizaron múltiples tinciones usando anticuerpos contra marcadores de linfocitos B. en resumen, después de la saturación con suero humano al 2 %, las células mononucleares se incubaron con los anticuerpos primarios o controles de isotipo apropiados durante 30 min a +4 °C en la oscuridad. Después, las células se lavaron y se fijaron en formaldehído al 1 % antes del análisis en un citómetro LSRII (BD Biosciences). Los datos de citometría de flujo se analizaron con el programa informático Diva (BD Biosciences).

10

Cultivo ex vivo de linfocitos B de infiltración tumoral

Se aislaron linfocitos B de infiltración tumoral totales de células mononucleares mediante selección positiva. En resumen, las células se incubaron en presencia de microesferas anti-CD19 (Miltenyi Biotec) y después se cargaron en columnas Macs (Miltenyi Biotec). Los linfocitos B recién aislados se cultivaron en presencia de Pansorbina (extracto de células de *Staphylococcus aureus*, Calbiochem) o línea celular de fibroblastos transfectados con ligando de CD40 murino (las células CD40-L L las proporcionó amablemente Schering-Plough, Laboratory for Immunological Research, Dardilly, Francia). El sobrenadante se recuperó cada 3 días hasta el día 9 y se crioconservó.

15

Análisis estadístico

Las variables tenidas en cuenta para el análisis estadístico incluyeron parámetros clínicos (edad, género, tabaquismo, recidiva del tumor y estado vital), histopatológicos (histología, pTNM, diferenciación tumoral, localización del tumor primario, necrosis, fibrosis, proliferación del tumor) e inmunológicos (véanse los marcadores descritos anteriormente). Para realizar análisis univariante, se definieron grupos de pacientes de acuerdo con la distribución bimodal de la densidad de células positivas que designan los siguientes cortes. (Linfocitos B CD20+ foliculares: 0,029 mm²/IPF del tumor, DC-Lamp: media de 1,65 células/IPF del tumor). Se usó ensayo de ji al cuadrado con corrección de Yates y ensayo ANOVA (ensayos post-hoc con métodos de Fisher y Bonferonni) para el análisis univariante. La curva de supervivencia específica de enfermedad (DSS) se estimó por el método de Kaplan-Meier y la significación de las diferencias entre los grupos de pacientes se evaluó por el ensayo del orden logarítmico. Se definió un evento que afecta a la OS como muerte por cualquier causa, DSS como muerte por NSCLC y DFS como recidiva del tumor primario. El análisis estadístico se realizó usando el programa informático StatView. Un valor $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

25

30

Resultados

1 - Ti-BALT contiene el mismo contingente de células inmunitarias que el observado en órganos linfoides secundarios

40 Para estudiar la función del compartimento de linfocitos B de Ti-BALT, primero se caracterizaron por inmunohistoquímica los linfocitos B y otras células inmunitarias en que estarán en contacto en estas estructuras linfoides terciarias. Como se describe en órganos linfoides convencionales, se observó que los linfocitos T CD3+ y las DC maduras de DC-Lamp+ se agrupan para formar las zonas ricas en linfocitos T mientras que la mayoría de los linfocitos B CD20+ se agregan en folículos B. Dentro de las zonas de linfocitos B, había diferentes células que no eran linfocitos B presentes. Se detectaron linfocitos T CD3+ que probablemente representan linfocitos T auxiliares foliculares, células dendríticas foliculares que se organizan en una red y una población especializada de macrófagos CD68+ también llamados macrófagos de cuerpo tangible.

45

En conclusión, la segregación de las células inmunitarias en Ti-BALT es igual a la observada en órganos linfoides secundarios, lo que sugiere que las respuestas inmunitarias pueden tener lugar dentro de estructuras linfoides ectópicas en cáncer broncopulmonar humano.

50

2 - Las zonas de linfocitos B de Ti-BALT tienen características de una respuesta inmunitaria humoral en curso

55

La segregación de zonas de linfocitos T y B es una obligatoriedad para el desarrollo de anticuerpos de alta afinidad con cambio de clase y también respuesta inmunitaria humoral de memoria. Por tanto, se evaluó la fase de diferenciación de linfocitos B dentro de los tumores broncopulmonares y se comparó con los órganos linfoides secundarios. Por inmunohistoquímica, primero se caracterizaron subconjuntos de linfocitos B de acuerdo con la clasificación Bm propuesta por el Dr. D. Capra (Pascual et al., J. Exp. Med., 1994). Como se observa en los folículos secundarios de ganglios linfáticos (fig. 1A), se muestra una acumulación de linfocitos B vírgenes IgD+ en zonas restringidas llamadas el manto (fig. 1B). Este manto rodeaba un centro germinal (GC) como se define por la presencia de células CD23+ que comprendía una red de células dendríticas foliculares y linfocitos B vírgenes Bm2 (fig. 1C-D). Los linfocitos GC-B también se caracterizaron por la expresión de AID (fig. 1E-F), la enzima crítica para la hipermutación somática, la recombinación de cambio de clase y la conversión génica de genes de inmunoglobulina (Ig). De una manera similar, los linfocitos GC-B eran positivos para el marcador de proliferación

60

65

Ki67 (fig. 1G-H) y Bcl6 (fig. 1I-J), pero no expresaban la proteína antiapoptótica Bcl2 (fig. 1K-L) en Ti-BALT y ganglios linfáticos. Basándose en la expresión de CD138, no se detectaron células plasmáticas (PC) en folículos B de Ti-BALT (datos no mostrados), de acuerdo con la situación observada en los ganglios linfáticos (fig. 1M). Sin embargo, se observaron PC CD138+ en el estroma y la fibrosis del tumor (fig. 1N).

5 A continuación, se comparó además la proporción de subconjuntos de linfocitos B intratumorales con ganglios linfáticos, así como sangre periférica por citometría de flujo. De acuerdo con la expresión de IgD y CD38 entre las células CD19+ totales, la distribución de los cinco subconjuntos de linfocitos B fue completamente distinta en NSCLC en comparación con ganglios linfáticos y sangre (fig. 2A). La sangre y los linfocitos LN-B eran principalmente de fenotipo virgen y de memoria (linfocitos B vírgenes IgD+ CD38bajo, linfocitos B de memoria IgD- CD38bajo, respectivamente). En contraste con la sangre y los ganglios linfáticos, cada fase de diferenciación de los linfocitos B se detectó en NSCLC. Se mostró que el porcentaje de linfocitos B de memoria y PC era estadísticamente mayor, y los linfocitos B vírgenes inferiores en NSCLC en comparación con los otros dos sitios (fig. 2B; 18 %, 48 % y 62 % de células de memoria; 1 %, 0,5 % y 28 % de PC; 75 %, 42 % y 4 % de linfocitos B vírgenes en sangre, ganglios linfáticos y NSCLC). La expresión diferencial de marcadores de linfocitos B adicionales (CD23, CD27, CD77) permitió estudiar la distribución de subconjuntos de linfocitos B vírgenes (Bm1 y Bm2), GC (Bm3 y Bm4) y de memoria (Bm5 temprano y Bm5 tardío) en NSCLC y ganglios linfáticos. Como se muestra en la fig. 2C, la diferencia principal entre los 2 sitios fue la proporción de Bm1/Bm2 que estaba a favor de Bm1 en tumor broncopulmonar. Las otras proporciones analizadas (Bm3/Bm4 y Bm5 temprano/Bm5 tardío) no fueron estadísticamente diferentes en los 20 2 sitios anatómicos.

En conjunto, estos datos demuestran que la fase de diferenciación de linfocitos B de infiltración tumoral está de acuerdo con su localización *in situ*, es decir, en o fuera de estructuras linfoides ectópicas. Los linfocitos B diferenciados tempranos se organizan en folículos B de Ti-BALT donde la mutación somática y las maquinarias de cambio de isotipo están activadas, lo que sugiere que Ti-BALT puede ser un sitio activo para la generación de linfocitos B de memoria y células de secreción de anticuerpos.

3 - La densidad de linfocitos B foliculares está correlacionada con supervivencia a largo plazo y su valor pronóstico está potenciado cuando se asocia con la densidad de DC maduras

30 La presencia de folículos B reactivos en algunos tumores broncopulmonares impulsó la investigación de su función inmunológica. Como se ha demostrado que la densidad de DC maduras estaba asociada con un resultado clínico favorable (Dieu-Nosjean et al., J. Clin. Oncol., 2008), se investigó si las densidades de linfocitos B foliculares y DC maduras estaban correlacionadas entre sí, así como su valor pronóstico. La figura 3A muestra que, incluso si el aumento global de la densidad de linfocitos B foliculares estaba asociado con un aumento global de la densidad de DC maduras, estos dos parámetros no estaban estadísticamente relacionados entre sí ($R^2 = 0,1224$), lo que sugiere su independencia recíproca. Mediante análisis univariante, a continuación se investigó el valor pronóstico de linfocitos B foliculares en solitario o en combinación con DC maduras. Las tasas de supervivencia específica de enfermedad de cuatro años fueron de un 97 % entre los pacientes con alta densidad de linfocitos B foliculares (Foll-CD20 alto) y un 65 % entre pacientes con baja densidad de linfocitos B foliculares (Foll-CD20 bajo) (fig. 3B). Por tanto, los pacientes con Foll-CD20 alto tienen una supervivencia más larga que pacientes con Foll-CD20 bajo ($P = 0,0099$), lo que demuestra que el número de linfocitos B foliculares estaba asociado con un pronóstico favorable. No hubo características clínicas (género, edad, historial de tabaquismo), tumorales (diferenciación tumoral, estadificación de pTNM, fibrosis, necrosis y células tumorales en proliferación) o histológicas distinguibles entre los pacientes con tumores Foll-CD20 alto frente a Foll-CD20 bajo (tabla 1). Se obtuvo un resultado similar para la densidad de DC maduras de DC-Lamp+ (fig. 3C), lo que indica que ambas células presentadoras de antígeno profesionales eran predictivas para la supervivencia. A continuación, se ensayó si los pacientes con tumores "DC-Lamp alto" y los pacientes con tumores "Foll-CD20 alto" eran iguales, y viceversa para los pacientes con tumores "DC-Lamp bajo" y "Foll-CD20 bajo". Entre los 74 pacientes, 31 pacientes (un 42 % de los pacientes) pertenecía a ambos grupos de tumores "DC-Lamp alto" y tumores "Foll-CD20 alto", 17 (un 23 % de los pacientes) pertenecían a ambos grupos de tumores "DC-Lamp bajo" y tumores "Foll-CD20 bajo" y 26 (un 35 % de los pacientes) eran mixtos. Entre este grupo mixto llamado "Foll-CD20/DC-Lamp mixto", 21 pacientes se caracterizaron con tumores "DC-Lamp alto" y tumores "Foll-CD20 bajo" y 5 pacientes con tumores "DC-Lamp bajo" y tumores "Foll-CD20 alto". La presencia de este grupo no solapante está a favor de una independencia entre estos 2 parámetros. Debido al número limitado de pacientes dentro de cada subgrupo del grupo mixto, se decidió mantener a los 26 pacientes dentro de un grupo único. Las curvas de Kaplan-Meier indicaron que un 100 % de los pacientes con "Foll-CD20/DC-Lamp alto" estaban vivos (ningún evento entre los 31 pacientes) después de un seguimiento de 48 meses (fig. 3D). Se descubrió que pacientes con baja densidad tanto de DC maduras intratumorales como de linfocitos B foliculares (grupo "Foll-CD20/DC-Lamp bajo") tenían un pronóstico muy malo con un 38 % de supervivencia de los pacientes después de 48 meses (6 eventos de 17 paciente). Las curvas de supervivencia de los pacientes con tumores de "Foll-CD20/DC-Lamp mixto" estaban entre estas dos curvas con un 86 % de pacientes vivos (3 eventos de 26 pacientes). La mediana de la supervivencia específica de enfermedad se alcanzó únicamente para los pacientes con tumores "FoN-CD20/DC-Lamp bajo" (42 meses, $P < 0,0099$).

65 En conclusión, se demostró que la densidad de linfocitos B foliculares de infiltración tumoral es muy predictiva de supervivencia específica de enfermedad en NSCLC en fase temprana. En comparación con la densidad de cada tipo

celular, la combinación tanto de DC maduras como de linfocitos B foliculares permite la identificación de un grupo de pacientes sin ningún evento y un grupo con la mayoría de eventos.

Ejemplo 2

5 1 - Valor pronóstico de linfocitos B foliculares y de células dendríticas maduras en pacientes tratados por quimioterapia neoadyuvante

10 La supervivencia de cinco años de pacientes con NSCLC en fase temprana es de un 70 % y cae hasta un 15 % para NSCLC metastásico en fase tardía. Los estudios han demostrado que combinaciones de dos fármacos son más eficaces que un tratamiento con un único agente (Schiller et al., 2000). Actualmente, los pacientes con NSCLC avanzado reciben una poliquimioterapia neoadyuvante (cisplatino más gemcitabina o carboplatino más paclitaxel) en muchos hospitales de América del Norte y Europa (Bunn et al., 2002; Rosell et al., 2002). Ahora, cada vez más pacientes con cáncer broncopulmonar en fase temprana también reciben quimioterapia neoadyuvante. La tasa de respuesta de combinaciones de dos fármacos es entre un 20 y un 30 % en NSCLC avanzado. Los informes recientes indican que los fármacos citotóxicos no solamente se están dirigiendo a células tumorales, sino que también pueden promover indirectamente el control del tumor facilitando el desarrollo de una respuesta inmunitaria dentro del microentorno tumoral (revisado en Zitvogel et al., 2008).

20 El cáncer broncopulmonar contiene células tumorales, así como componentes del estroma: la vasculatura, tejido conjuntivo y células de infiltración inmunitarias. Entre el infiltrado de células inmunitarias, algunas de ellas son profesionales para la presentación de antígenos procesados, como las DC, los linfocitos B y los macrófagos. Recientemente, se ha demostrado que la densidad de diferentes subconjuntos de DC (células de Langerhans epiteliales, DC intersticiales del estroma y DC maduras) estaba asociada con un resultado favorable en pacientes con NSCLC (Dieu-Nosjean et al., 2008; Fridman et al., 2011). Ahora, se muestra que la densidad de DC madura aún está correlacionada con una supervivencia a largo plazo para pacientes con NSCLC avanzado tratados por quimioterapia neoadyuvante (n=56 pacientes, P=0,0373, véase la figura 4). Como los Ti-BALT están presentes en pacientes tratados con quimioterapia, la densidad de linfocitos B, otra población de células presentadoras de antígeno, puede asociarse con el resultado de pacientes tratados por quimioterapia. La densidad de linfocitos B también puede verse afectada por el tipo de las combinaciones de dos fármacos. Por tanto, el marcador de linfocitos B se correlacionará con la respuesta clínica al tratamiento. Este biomarcador puede usarse para discriminar entre pacientes que responderán y pacientes que no responderán al tratamiento y, por tanto, permitiendo un diseño del tratamiento más racional y dirigido.

35 Ejemplo 3

En esta ocasión, se evaluó el valor pronóstico de linfocitos B foliculares, DC maduras o la combinación de ambos tipos de células inmunitarias en un estudio retrospectivo de 122 pacientes con fase avanzada de NSCLC y tratados por quimioterapia neoadyuvante. Se demostró que la densidad de cada parámetro inmunitario estaba correlacionada con un resultado favorable. Las curvas de Kaplan-Meier indicaron que la densidad de linfocitos B foliculares CD20+ estaba asociada con supervivencia global más larga (OS, P=0,007) (fig. 5A). La mediana de OS fue de 55 meses para los pacientes caracterizados con tumores Foll-CD20 alto mientras que la mediana de OS fue de 18 meses para pacientes con tumores Foll-CD20 bajo. La densidad de DC maduras DC-Lamp+ también se correlacionó con un mejor resultado clínico (fig. 5B, P=0,04). La mediana de OS fue de 55 meses para los pacientes con tumores DC-Lamp alto mientras que la mediana de OS fue de 24 meses para pacientes con tumores DC-Lamp bajo.

Como Foll-CD20 y DC-Lamp influyen positivamente en la supervivencia del paciente, se estratificó a los pacientes en 3 grupos de acuerdo con las densidades alta/baja de cada marcador (Foll-CD20/DC-Lamp alto, Foll-CD20/DC-Lamp mixto y Foll-CD20/DC-Lamp bajo). Los pacientes con alta densidad de ambos tipos de poblaciones inmunitarias estaban en bajo riesgo de muerte (no se alcanzó la mediana de OS) (fig. 5C, P=0,003). Los pacientes con bajas densidades de linfocitos B foliculares y también DC maduras estaban en riesgo muy alto de muerte (la mediana de OS fue de 18 meses), lo que demuestra que la combinación de ambos marcadores inmunitarios permite la identificación de un subgrupo de pacientes con un resultado muy malo a pesar de la quimioterapia. Los pacientes con tumores "Foll-CD20/DC-Lamp mixto" estaban en riesgo intermedio de muerte (la mediana de OS fue de 34 meses).

Estos datos estaban de acuerdo con los análisis univariantes (tabla 3), que muestran que la densidad de cada tipo de célula inmunitaria está muy asociada con la supervivencia de pacientes tratados por quimioterapia (Foll-CD20 con una tasa de riesgo (HR) = 0,41 y P=0,00095; DC-Lamp con una HR=0,50 y P=0,00721). De forma más interesante, la combinación de ambos biomarcadores fue el mejor indicador para la supervivencia (HR=0,50, P=0,00097) en comparación con los parámetros clínicos convencionales.

En conjunto, se ha demostrado que la combinación de los marcadores CD20 y DC-Lamp puede discriminar pacientes con riesgo muy alto de muerte entre pacientes con NSCLC en fase avanzada tratados por quimioterapia neoadyuvante.

Referencias

Durante toda esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

- 5 Brambilla E, Travis WD, Colby TV, et al.: The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J.* 2001; 18:1059-1068.
 Bunn PA Jr: Treatment of advanced non-small-cell lung cancer with two-drug combinations. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20:3565-3567.
- 10 Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, Lebecque S, Fridman WH, Cadranet J. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol.* 2008; 26(27):4410-7.
 Finkelstein DM, Cassileth BR, Bonomi PD, et al.: A pilot study of the Functional Living Index-Cancer (FLIC) Scale for the assessment of quality of life for metastatic lung cancer patients: An Eastern Cooperative Oncology Group study. *Am J Clin Oncol.* 1988; 11:630-633.
- 15 Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY, Menetrier-Caux C. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* 2009; 69(5):2000-9.
 Mountain CF: Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest.* 1997; 111:1710-1717.
- 20 Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med.* 1994; 180(1):329-39.
 Piemonte M: International Union Against Cancer: TNM Classification of Malignant Tumors (ed. 6). Nueva York, NY, Wiley-Liss, 2002.
- 25 Rosell R, Gatzemeier U, Betticher DC, et al.: Phase III randomised trial comparing paclitaxel/carboplatin with paclitaxel/cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: A cooperative multinational trial. *Ann. Oncol.* 2002; 13:1539-1549.
 Sautes-Fridman C, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Fisson S, Fridman WH, Cremer I, Dieu-Nosjean MC. Tumor microenvironment is multifaceted. *Cancer Metastasis Rev.* 2011; 30(1): 13-25.
- 30 Schiller JH, Harrington D, Belani C, et al.: Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non small cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2000; 346:92-98.
 Sobin L, Wittekind. TNM classification of malignant tumors, Wiley-Liss, ed. 6, Nueva York, 2002.
 Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Rev. Immunol.* 2008 ;8(1):59-73.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para el pronóstico del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido con estructuras linfoides inducidas por tumor, que comprende las siguientes etapas:
- 5
- a) cuantificar, en una estructura linfoide inducida por tumor, la densidad celular de linfocitos B foliculares, y
 - b) comparar la densidad celular del valor de linfocitos B foliculares obtenido en la etapa a) con un valor de referencia predeterminado; y
 - c) proporcionar un pronóstico favorable de tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando la densidad
- 10 celular de los linfocitos B foliculares es mayor que dicho valor de referencia predeterminado, o
- proporcionar un mal pronóstico de tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando la densidad celular de linfocitos B foliculares es inferior a dicho valor de referencia predeterminado.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que la supervivencia es la supervivencia específica de enfermedad (DSS), la supervivencia sin enfermedad (DFS) o la supervivencia global (OS).
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende además las etapas de:
- 20
- a) cuantificar en el tumor completo la densidad celular de células dendríticas maduras, y
 - b) comparar la densidad celular del valor de células dendríticas maduras obtenido en la etapa a) con un valor de referencia predeterminado; y
 - c) proporcionar un pronóstico favorable de tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando las densidades
- 25 celulares tanto de los linfocitos B foliculares como de las células dendríticas maduras son mayores que dichos valores de referencia predeterminados,
- proporcionar un mal pronóstico de tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando las densidades celulares tanto de los linfocitos B foliculares como de las células dendríticas maduras son inferiores a dichos valores de referencia predeterminados o
- 30 proporcionar un pronóstico intermedio de tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando un valor de las densidades celulares de linfocitos B foliculares y de las células dendríticas maduras es inferior a dicho valor de referencia predeterminado y el otro valor es mayor que dicho otro valor de referencia predeterminado.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cáncer sólido se selecciona del grupo que
- 35 consiste en cánceres broncopulmonares, cánceres colorrectales y cánceres de mama.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el cáncer sólido es un cáncer broncopulmonar.
6. El método de la reivindicación 4, en el que el cáncer sólido es un cáncer broncopulmonar no microcítico.
- 40 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el paciente es un paciente con una fase temprana de cáncer.
8. El método de la reivindicación 7, en el que el paciente es un paciente con fase temprana de cáncer que no recibió ningún tratamiento neoadyuvante o adyuvante.
- 45 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el paciente es un paciente con fase avanzada de cáncer.
- 50 10. El método de la reivindicación 9, en el que el paciente es un paciente con fase avanzada de cáncer que recibe tratamiento adyuvante.

Figura 1

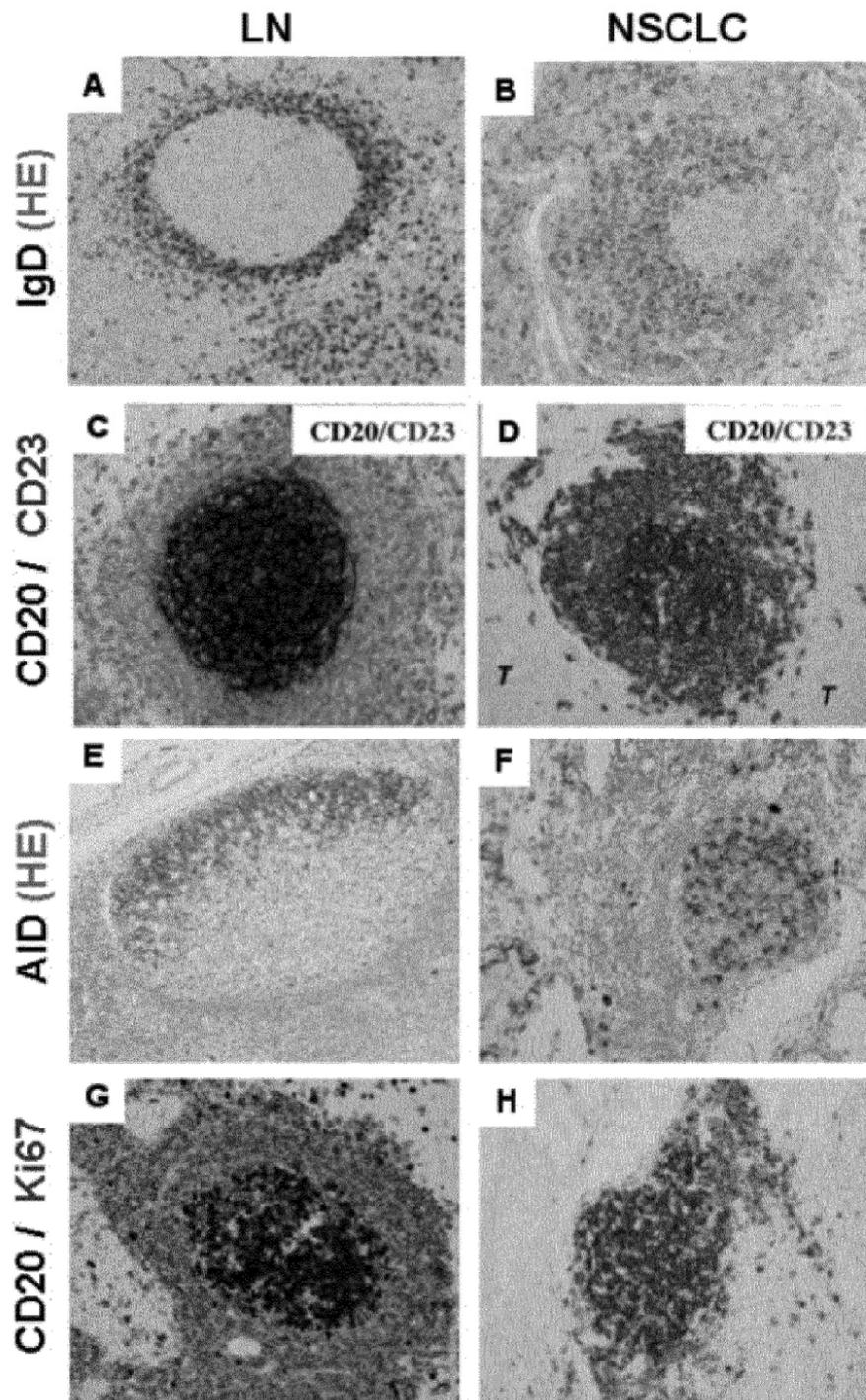
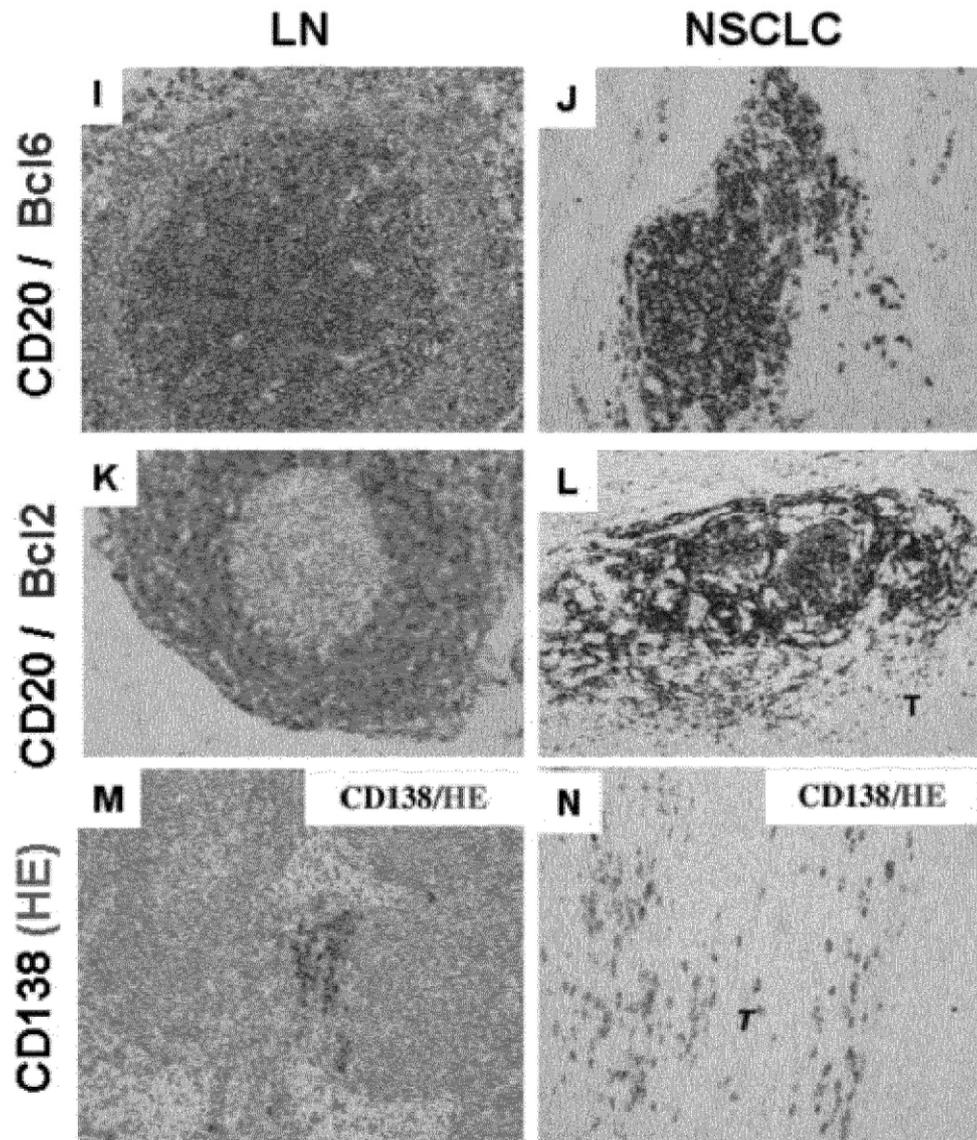


Figura 1 (continuación)



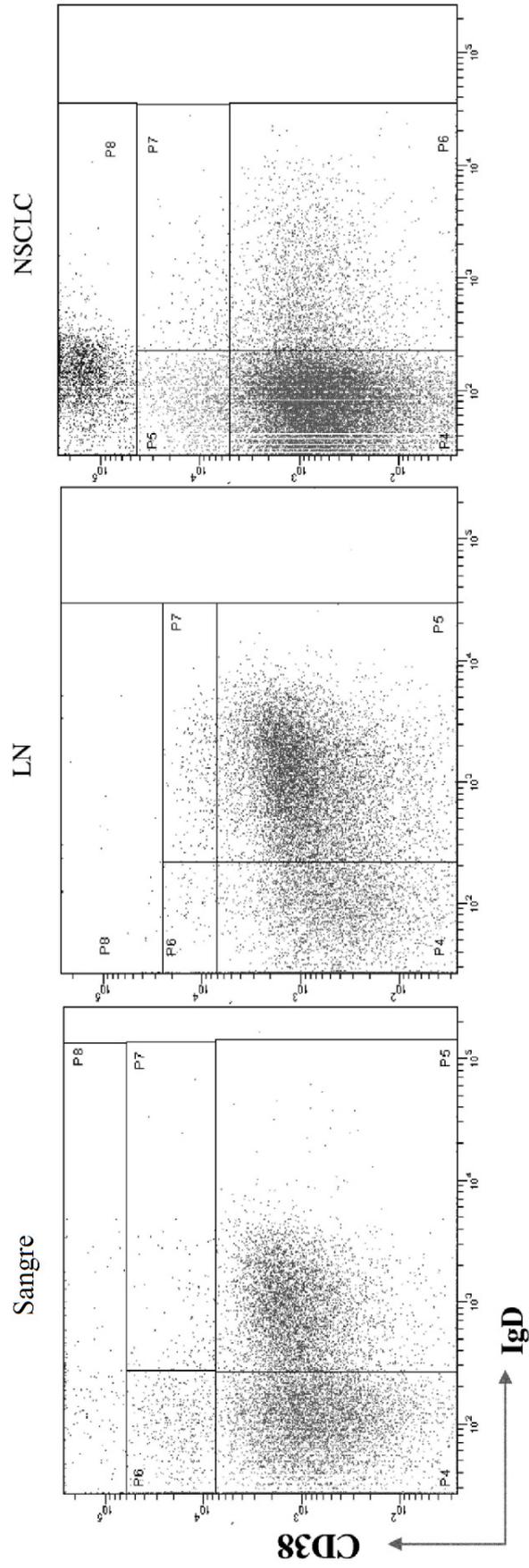


Figura 2A

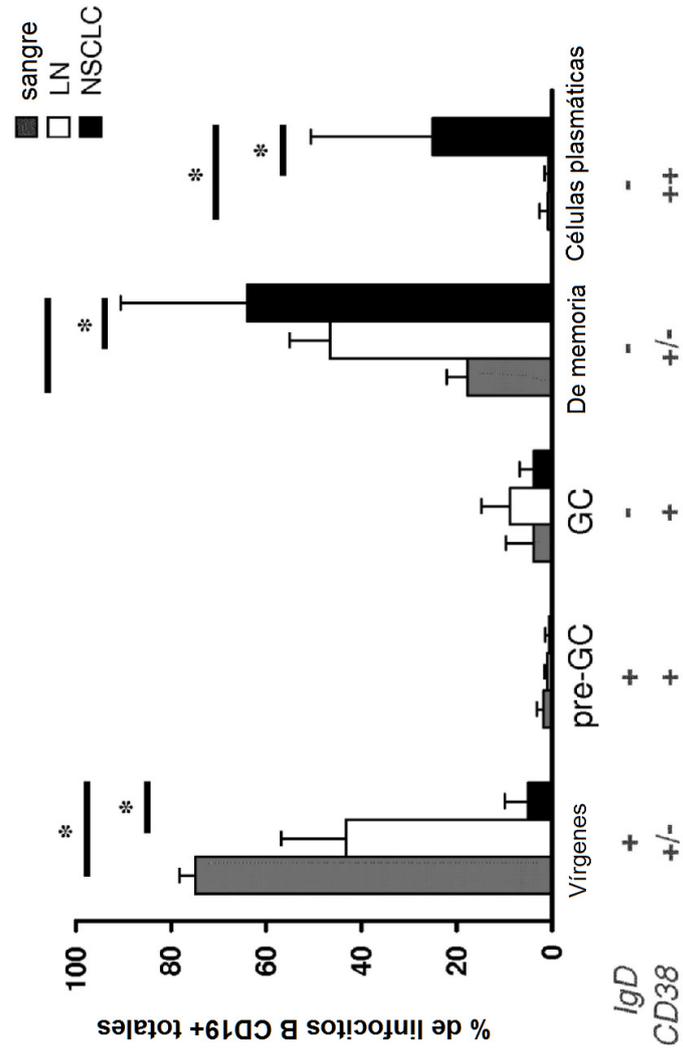


Figura 2B

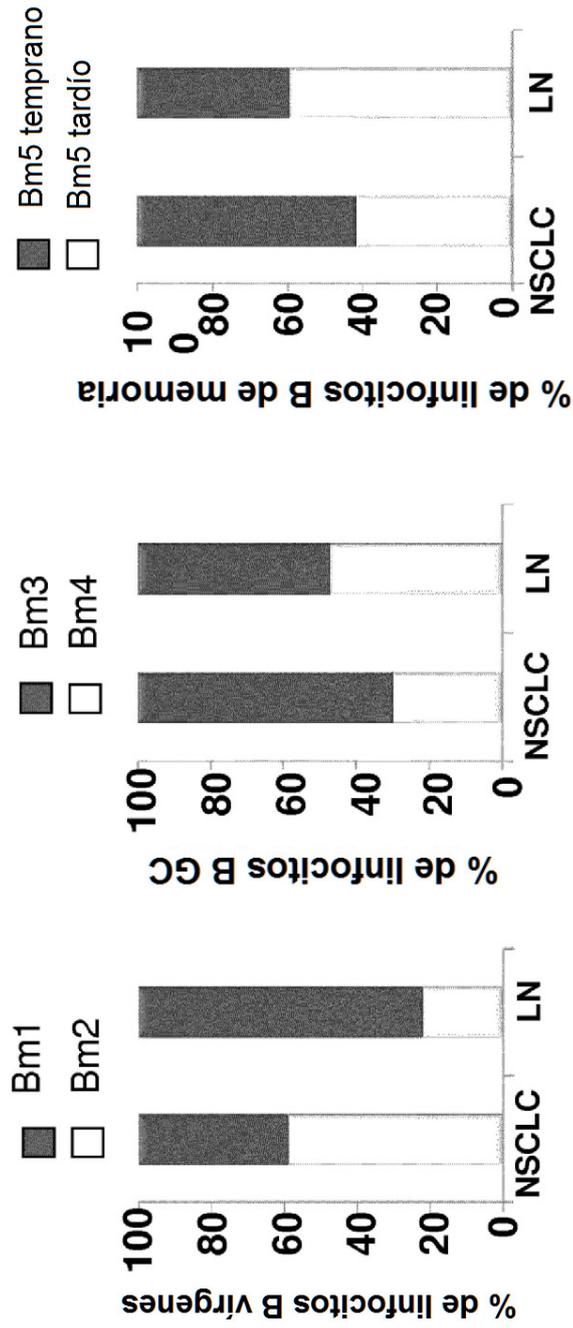


Figura 2C

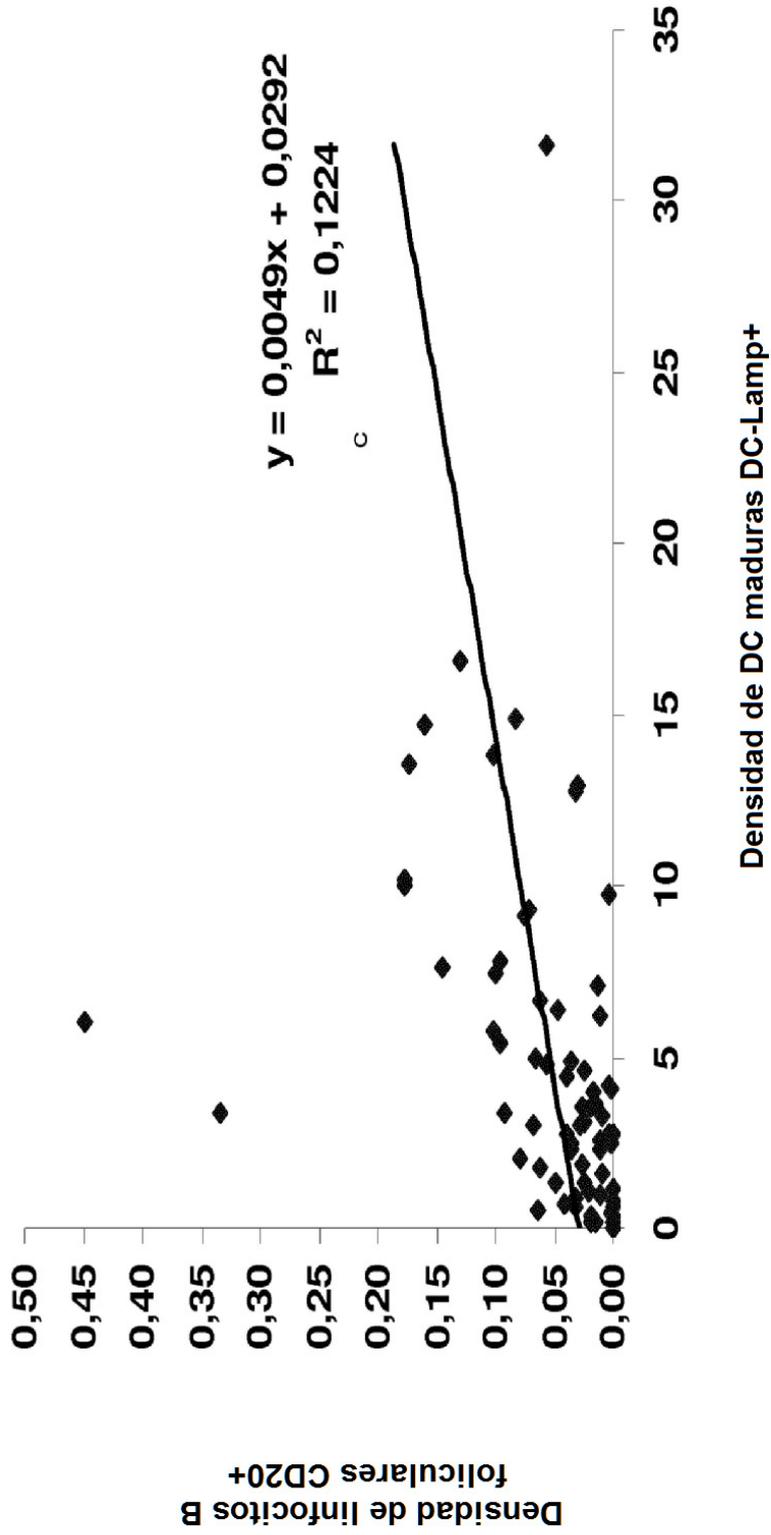


Figura 3A

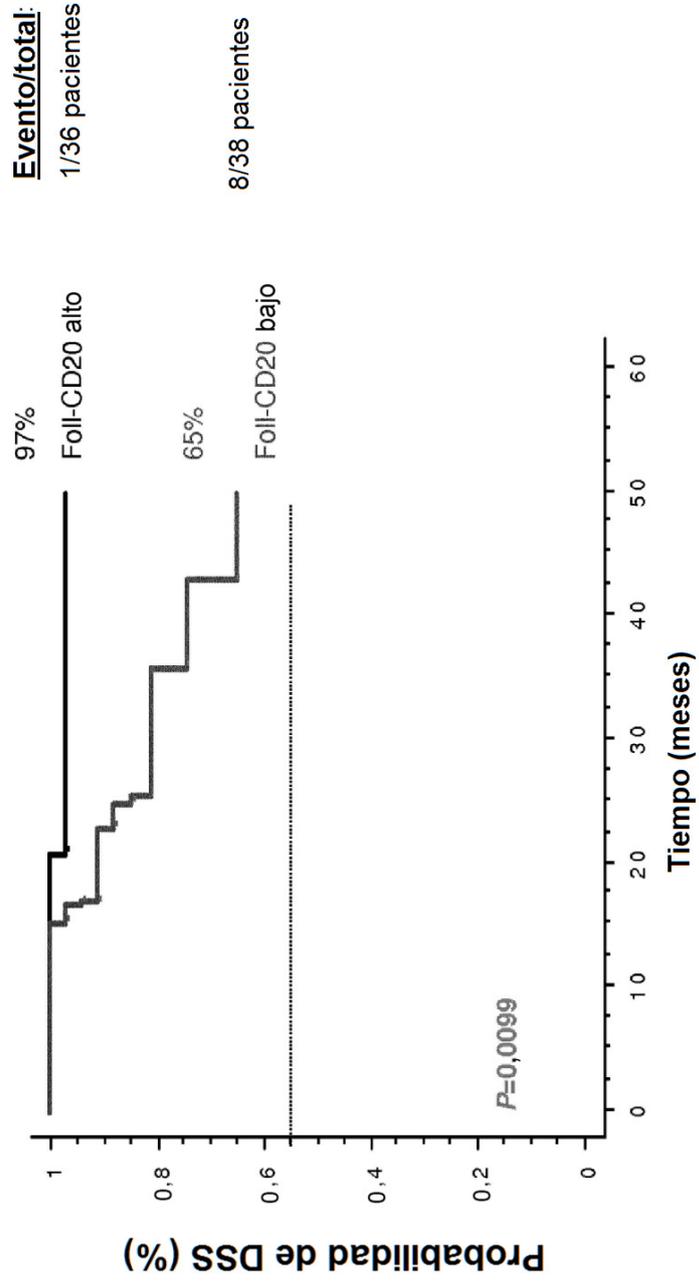


Figura 3B

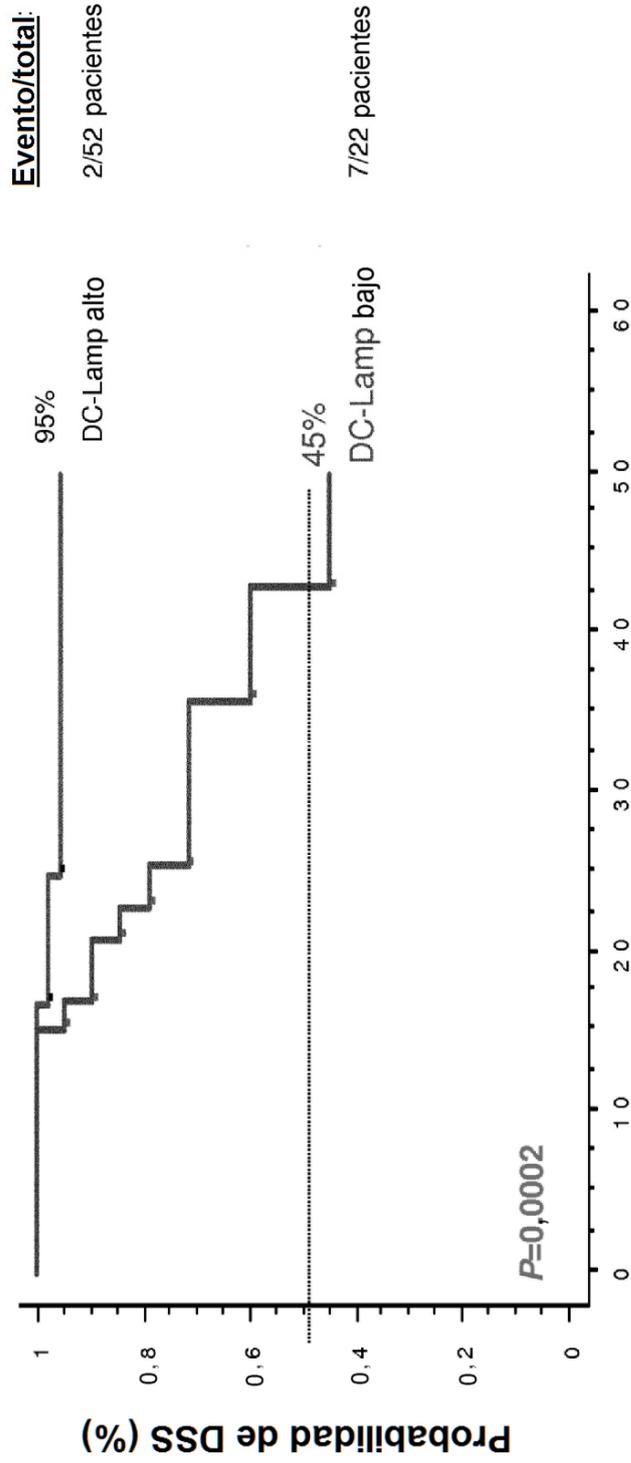


Figura 3C

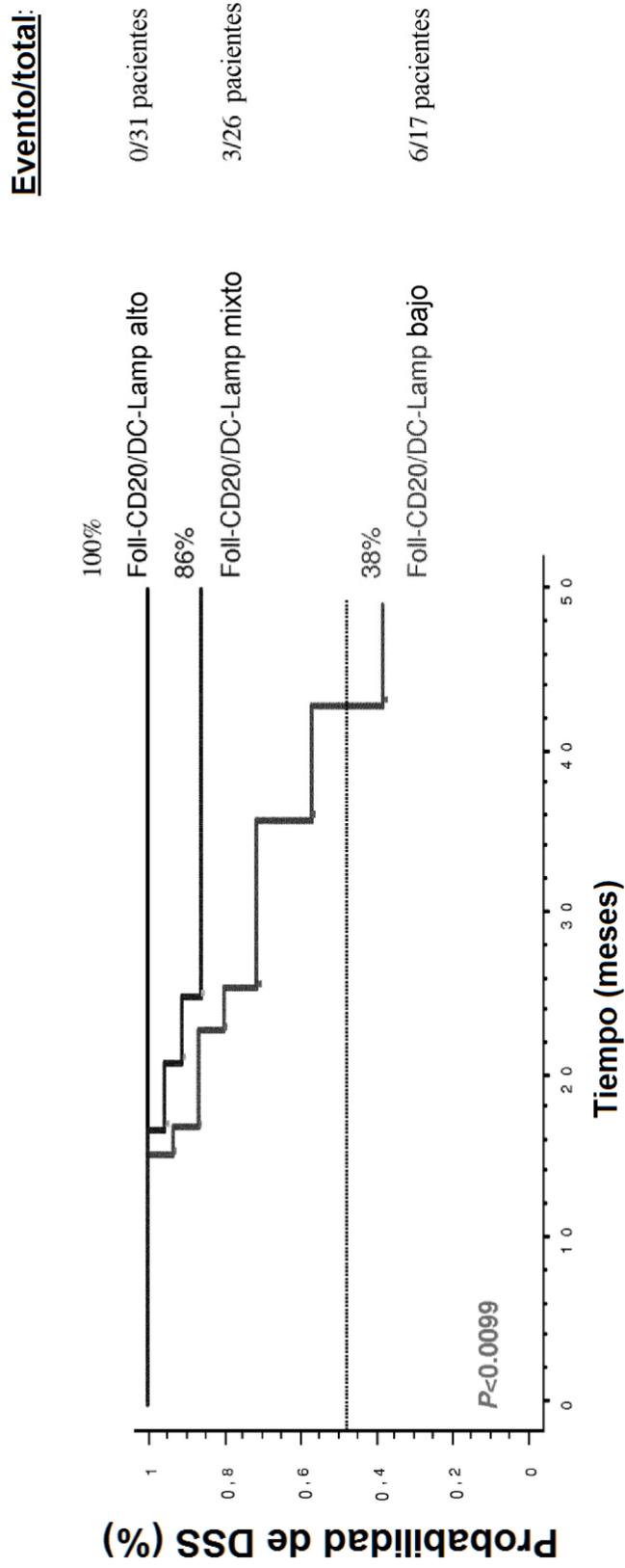


Figura 3D

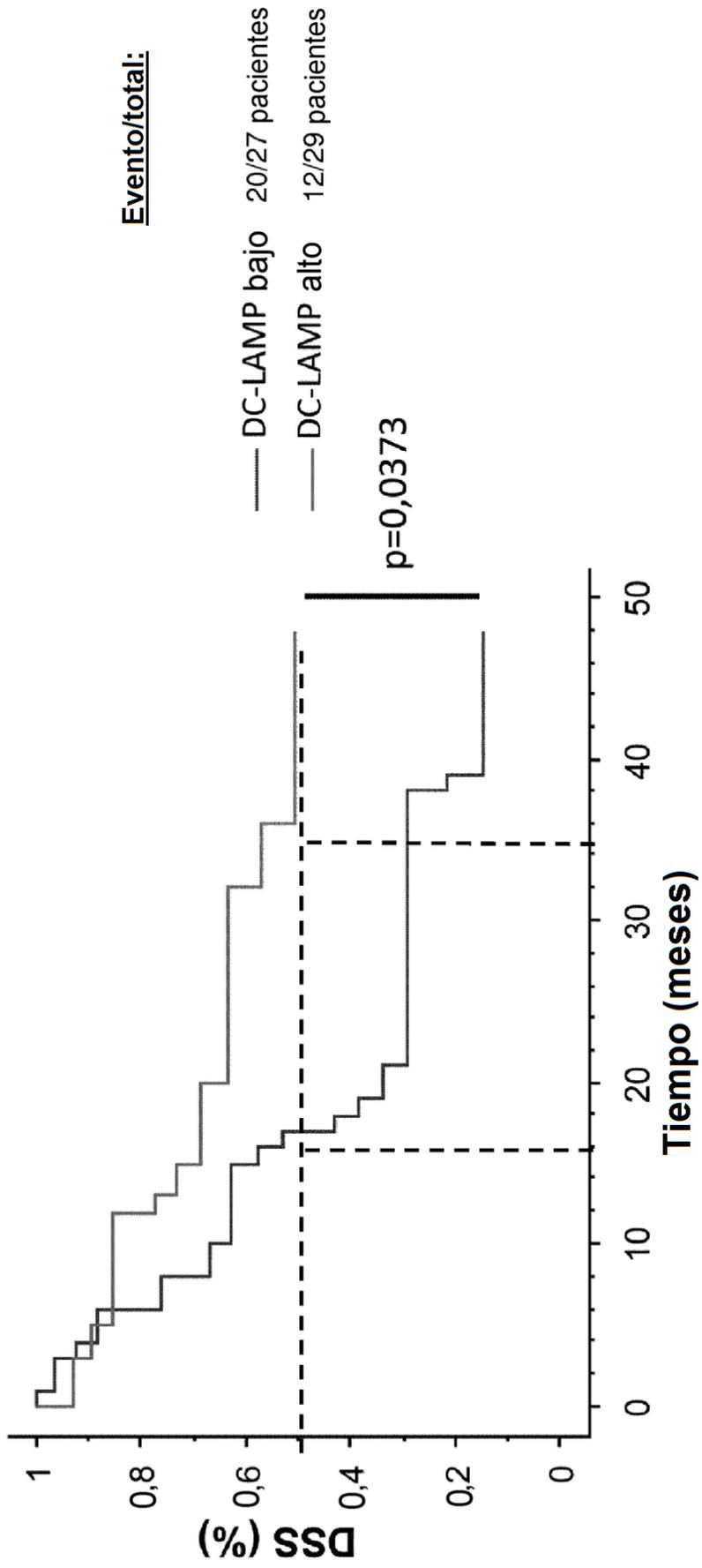


Figura 4

Figura 5

